



TITLE:

Biochemical analysis and morphological characterization of deep-sea hydrothermal field endemic crab, *Shinkaia crosnieri*, associated with episymbionts(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Fujiyoshi, So

CITATION:

Fujiyoshi, So. Biochemical analysis and morphological characterization of deep-sea hydrothermal field endemic crab, *Shinkaia crosnieri*, associated with episymbionts. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20442>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	藤吉 奏
論文題目	Biochemical analysis and morphological characterization of deep-sea hydrothermal field endemic crab, <i>Shinkaia crosnieri</i> , associated with episymbionts (外部付着共生細菌を有する深海熱水域固有甲殻類 <i>Shinkaia crosnieri</i> の生化学的、形態学的解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>深海底熱水活動域は、暗黒、高水圧、ときに 300℃を超える熱水が噴き出す極限環境でありながら、熱帯雨林にも匹敵する独自の豊かな生態系が育まれている。熱水活動域周辺に生息する甲殻類や貝類の多くは、これら化学合成独立栄養細菌に栄養のほぼ全てを依存しており、絶対的な共生関係が構築されている。沖縄トラフの熱水活動域に優占する固有甲殻類の一種ゴエモンコシオリエビ <i>Shinkaia crosnieri</i> は、腹部に豊かな剛毛を有しており、剛毛表面には形態的にも系統的にも特異な共生細菌が密生している。近年、ゴエモンコシオリエビがそれら付着共生細菌を摂餌することで、エネルギーを獲得していることが明らかとなった。しかし、共生関係の構築に関わる詳細な機構は未だ解明されていない。</p> <p>ゴエモンコシオリエビと化学合成独立栄養細菌の共生メカニズムを明らかにするため、非共生性甲殻類および共生性甲殻類の腹部剛毛を用いて顕微鏡観察による構造解析、剛毛密度測定、流体シミュレーションおよび粒子接触試験を行った。その結果、共生性であるゴエモンコシオリエビ剛毛は、他の非共生性甲殻類の剛毛よりもスパイク（剛毛上にある棘状構造）が有意に短いこと、スパイク長が短いほど剛毛周りにおいて流速の低下する範囲が縮小すること、スパイク長と剛毛に接触する粒子数は負の相関関係であることがわかった。すなわち、スパイク長が短いほど、剛毛本体が流体や流体中の粒子に曝されやすいことが明らかとなった。これらのことから、ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛は、熱水成分を共生細菌に供給して生育を促進させる構造となっており、共生細菌を培養するのに適していることが示唆された。</p> <p>レクチンは、細胞表面糖鎖を構造特異的に認識し結合するタンパク質であるため、特異的な共生関係を成立させることができる。レクチンを探索する際は、血球や細胞を用いた凝集反応や、レクチンへの認識糖添加により凝集反応が拮抗的に阻害されることを利用する（阻害糖試験）。本研究では、深海由来の希少サンプルに適したレクチン活性検出法を検討し、一般的に用いられる試料量を5分の1に削減できる検出法の構築に成功した。さらに、ゴエモンコシオリエビ血清について、8種類の糖アフィニティークロマトグラフィーや各種塩濃度に調整したバッファーを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、レクチン様タンパク質を分画した。それぞれの分画画分について、構築した活性測定法を用いた凝集反応や SDS-PAGE により活性およびタンパク質の有無を調べた。しかし、ゴエモンコシオリエビ血清のレクチン様タンパク質は、各種クロマトグラフィーを用いた分画では凝集活性が失われたため精製は困難であった。今後、さらなる精製法の検討が必要である。</p> <p>前項で構築した活性測定法により、ゴエモンコシオリエビ血清におけるレクチン活性を4種類の動物血球（ウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ）を用いた血球凝集反応試験、および16種類の糖または糖タンパク質の添加による阻害糖試験により解析し</p>			

た。その結果、2種類の動物血球の凝集を確認し、8種類の糖による凝集の阻害が観察された。これらのことから、ゴエモンコシオリエビ血清中にレクチンが存在することが明らかとなった。活性は70℃で30分加熱しても安定であり、100℃で30分加熱しても残存していた。また、血清を培養が困難なゴエモンコシオリエビ腹部剛毛共生細菌や、様々な系統関係にある培養細菌細胞と混合した結果、血清成分が腹部剛毛付着共生細菌および一部の培養細胞に特異的に結合することが明らかとなった。さらに、共生細菌に対する結合は糖を添加しても維持されたことから、ゴエモンコシオリエビ血清中にはレクチン以外の共生関連物質が存在する可能性が示された。

これらの結果から、ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛の特殊な構造は、毛と熱水中に含まれる溶存物質や懸濁粒子との接触の機会を増やすことにより、共生細菌に栄養を効率よく供給している可能性が示された。また、ゴエモンコシオリエビの血清中に初めてレクチン活性を見出し、血清成分が一部の腹部剛毛付着共生細菌および一部の非共生細菌に特異的に結合することを明らかにした。一部の共生細菌に対する結合は糖を添加しても維持され、このことはこれまで知られているレクチンを介したモデル共生系とは異なり、ゴエモンコシオリエビ血清中にレクチン以外の共生関連物質が存在する可能性が示された。深海熱水域固有甲殻類ゴエモンコシオリエビと化学合成独立栄養細菌の外部共生において、腹部剛毛の構造や血清中の成分が重要な役割を果たすことが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

沖縄トラフの熱水活動域に優占する固有甲殻類の一種ゴエモンコシオリエビ *Shinkaia crosnieri* は、腹部に豊かな剛毛を有しており、剛毛表面には形態的にも系統的にも特異な共生細菌が密生している。近年、ゴエモンコシオリエビがそれら付着共生細菌を摂餌することで、エネルギーを獲得していることが明らかとなった。しかし、共生関係の構築に関わる詳細な機構は未だ解明されていない。本論文において、ゴエモンコシオリエビと化学合成独立栄養細菌の共生メカニズムを明らかにするため、非共生性甲殻類および共生性甲殻類腹部剛毛の構造解析および流体シミュレーションを行った。さらに、生化学的解析として希少サンプルに適したレクチン活性検出法の構築とレクチンの精製、ゴエモンコシオリエビ血清中レクチンの解析を行った。主な成果は、以下の3点に大別される。

(1) 共生性であるゴエモンコシオリエビの腹部剛毛は、他の非共生性甲殻類の剛毛よりもスパイクが有意に短く、流体シミュレーションによりスパイク長が短いほど剛毛周りにおいて流速の低下する範囲が縮小することを明らかにした。これらの結果より、ゴエモンコシオリエビ腹部剛毛は、熱水成分を共生細菌に供給して生育を促進させる構造となっており、共生細菌を培養するのに適していることが示唆された。

(2) サンプルングが難しい深海からの希少サンプルに適したレクチン活性の微量検出法を検討し、一般的に用いられる試料量を5分の1に削減できる検出法の構築に成功し、当該検出法がゴエモンコシオリエビ血清中レクチンの精製に適応できることを明らかにした。

(3) ゴエモンコシオリエビ血清中にレクチンが存在すること、共生細菌に対する結合は糖を添加しても維持されることを明らかにし、ゴエモンコシオリエビ血清中にレクチン以外の共生関連物質が存在する可能性を示した。

以上のように、本論文は熱水活動域固有甲殻類ゴエモンコシオリエビと化学合成独立栄養細菌の共生関係について、重要かつ基礎的な知見を提供したものであり、海洋微生物学、微生物生態学、海洋生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)